

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 461 724

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 79 18780

(54) Polymères substitués par des groupes leur conférant des propriétés anticoagulantes et leur procédé de préparation, objets constitués par et/ou comprenant lesdits polymères et leurs procédés de fabrication, application desdits objets en chirurgie et en médecine, et compositions pharmaceutiques contenant lesdits polymères substitués.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 9) C 08 F 9/36; A 61 K 31/745; A 61 M 25/00; C 08 F 12/08 / A 61 F 1/00.

(22) Date de dépôt 20 juillet 1979.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 6 du 6-2-1981.

(71) Déposant : FOUIGNOT Christine, JOZEFONVICZ Jacqueline, née DORGEBRAY et JOZEFONVICZ Marcel, résident en France.

(72) Invention de : Christine Fougnot, Jacqueline Jozefonvicz née Dorgebray et Marcel Jozefonvicz.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Ores,
6, av. de Messine, 75008 Paris.

La présente invention est relative à des polymères substitués par des groupes leur conférant des propriétés anticoagulantes et à leur procédé de préparation, aux objets constitués par et/ou comprenant lesdits polymères substitués, à leurs
5 procédés de fabrication et à l'application desdits objets en chirurgie et en médecine, et aux compositions pharmaceutiques contenant lesdits polymères substitués.

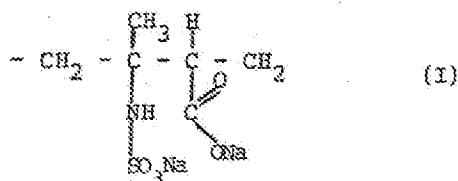
L'héparine, agent anticoagulant naturel du sang, constitue un médicament de choix dans les affections thromboemboliques. Aussi, en vue de pallier les inconvénients de l'héparine, depuis un certain nombre d'années déjà, on a essayé de suppléer
10 cette précieuse matière par divers produits synthétiques ou semi-synthétiques.

Ainsi, on a préconisé : - le sulfate de chondroïtine, (qui est également un polyholoside hétérogène), - le chitosane (produit de dédoublement de la chitine) préparé par la N-Gésacétylation totale de la chitine [HORTON et JUST "Carbohydrate Research 29 (1973) 173-179], - le chitosane sulfaté [WOLFROM et SHENHAN JACS (1959) 81 ; 1764-1766], - le sulfate d'héparane
20 [JORGES et GARDELL "J. Biol. Chem. 176-267 (1948)] et d'autres polysaccharides formés par la polymérisation d'une unité disaccharidique constituée par une osamine (principalement la D-glucosamine) portant un certain nombre de groupements sulfate et/ou sulfonate et par un acide uronique (généralement l'acide
25 D-glucuronique et l'acide L-iduronique). Outre le fait que l'action "heparin-like" de ces divers produits est moins prononcée que celle de l'héparine, leur origine naturelle est la cause (comme c'est le cas pour l'héparine) de leur variabilité et de leur hétérogénéité d'une préparation à l'autre.

30 Une autre série d'héparinoïdes est constituée par des produits dérivés de l'amylose (lequel, comme l'héparine a des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$, qui ont été étudiés, entre autres, par WOLFROM et WANG (Carbohydrate Research 18 (1971) 23-27) concernant l'amylose aminé et sulfaté et par HORTON et JUST (Carbohydrate
35 Research 30 (1973) 349-357) concernant la conversion de l'amylose en (1+4)2-amino-2-déoxy- α -D-glucopyranuronane. Les produits ainsi obtenus ont une activité héparinique faible ou pratiquement nulle (amylose aminé et sulfaté).

On a également proposé (Brevet français 2 280 387) des dérivés sulfonés de polypeptides, à savoir des copolymères de la lysine et du tryptophane. Si ces produits provoquent effectivement un allongement très net du temps de coagulation et ont une action du même type que celle de l'héparine, ils ne peuvent pas être utilisés sur une grande échelle, car les réactions secondaires qu'ils provoquent dans l'organisme humain sont extrêmement gênantes.

En 1975, Harry P. GREGOR [*Polym. Sci. Technol. U.S.A.* (1975) 7, 51-56] a préconisé l'utilisation, en tant que matériaux "heparin-like", de polymères et de copolymères sulfonés (en particulier des acides polystyrène-sulfonique et polyéthylènesulfonique). T. BEUGELING et Collab. [*J. BIOMED. MATER RES.* (1974) Vol. 8, 375-379 et *BIOCOMPAT. IMPLANT. MATER.* 187-192 (1976)] ont préconisé l'utilisation de polymères synthétisés à partir de polyisoprènes, dont le motif est représenté comme suit :



qui sont des dérivés contenant des groupes aminosulfonates et carboxylates.

Ces Auteurs ont obtenu essentiellement des dérivés solubles dont l'activité anticoagulante ne représente cependant que 12 à 15 % de celle de l'héparine prise comme référence.

D'autres tentatives intéressantes ont été effectuées par greffage de la molécule d'héparine elle-même sur la surface des polymères [par exemple à l'aide de l'agent de couplage constitué par le chlorure de tridodécylméthylammonium : LEININGER et Collab. dans *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* 18 312 (1972) etc...] ou par des liaisons de covalence : HOFFMAN et Collab. dans *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* 18 10 (1972), etc...]. Malheureusement, outre le fait que l'on ne parvient à fixer qu'une quantité relativement faible d'héparine, ces polymères "héparinisés" ne sont pas stables : la quantité fixée a tendance à s'inactiver avec le temps.

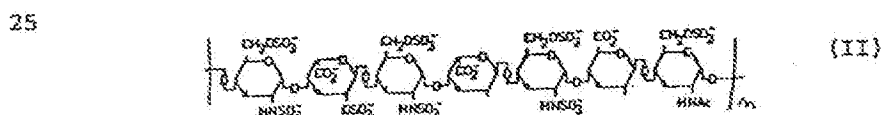
D'une manière générale, l'intérêt qu'il y aurait à pou-

voir disposer d'un produit à action anticoagulante non seulement stable, reproductible et homogène d'un lot à l'autre, mais également insoluble si on le désire, est à l'origine des nombreux travaux de recherche de nouveaux anticoagulants.

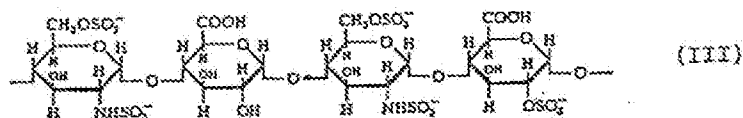
5 C'est ainsi qu'on a obtenu des produits très actifs par greffage chimique ou radiochimique de monomères vinyliques sur l'héparine [cf. les travaux de C. BAQUEY et Collab. dans Ann. Phys. Biol. Med. 9 (2) 131-138 (1975) et de D. LABARRE, Thèse de Doctorat d'Etat Paris (1977)]. Les polymères insolubles ainsi ob-
10 tenus sont inutilisables dans la pratique, car en plus de l'inactivation qu'elle subit avec le temps, l'héparine greffée migre à l'intérieur de la molécule au cours de la mise en œuvre de ces produits, et se trouve totalement masquée.

En examinant les propriétés anticoagulantes des diffé-
15 rents composés énumérés ci-dessus, les Demandeurs ont formulé une hypothèse selon laquelle les propriétés anticoagulantes de l'héparine ne sont pas liées à sa structure secondaire ou tertiaire, mais plus précisément à la nature des différents groupes portés par la chaîne polysaccharide et à la combinaison des effets de
20 ces groupes, qui aurait un résultat coopératif multiplicateur de l'activité de chacun d'entre eux vis-à-vis de la thrombine et de l'antithrombine III.

On considère que l'héparine, généralement représentée par la formule II ci-après :



possède également des séquences non O-sulfatées ou 3-O-sulfatées
30 du résidu glucosamine



35 Par ailleurs, on a préparé des résines échangeuses d'ions utiles pour la chromatographie liquide des mélanges racémiques, lesquelles résines sont essentiellement constituées par des polystyrènes sur lesquels ont été fixés les acides aminés

suivants : l'alanine, la valine, la norvaline, la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la tyrosine, la sérine, la thréonine, l'acide aspartique, la proline, l'hydroxyproline et l'acide glutamique [cf. en particulier les travaux effectués par VESA et Collab., Zh. Obsch. Khim. SSSR 42 (12) 2780 (1972) et Tr. Akad. Nauk. Lit. SSR. Ser. B. 2-69, 93 (1972) et par PETIT et JOZEFONVICZ (Jour. of Applied Polymer Sci. Vol. 21 2589-2596 (1977))].

Partant de leur hypothèse relative à l'importance de la présence simultanée des groupes qui figurent dans les formules II et III ci-dessus, sur un support macromoléculaire, les Demandeurs ont pu mettre en évidence que de telles résines échangeuses d'ions présentent des applications en tant qu'agents doués d'une action anticoagulante.

La présente invention a pour objet des produits doués de propriétés anticoagulantes, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des polymères (homopolymères ou copolymères) comportant dans leur chaîne des groupes substituables sur lesquels sont fixés de façon statistique, des groupes X et Y, où

X désigne SO_3R_1

R_1 étant un atome d'hydrogène ou d'un métal physiologiquement compatible,

et Y désigne le groupe $-\text{SO}_2-\text{R}_2$

R_2 étant le reste d'un acide aminé lié au pont $-\text{SO}_2-$

par sa fonction amine $-\text{NH}-$.

Conformément à l'invention, les acides aminés sont choisis parmi ceux qui comportent au moins une fonction carboxylique libre et s'ils possèdent plusieurs fonctions amine, toutes sauf une doivent être bloquées par un groupe électroattracteur physiologiquement acceptable.

Suivant une modalité particulière de ce mode de réalisation, le groupe électroattracteur est avantageusement constitué par le benzyloxycarbonyle ou le tertibutyloxycarbonyle.

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'objet de la présente invention, les polymères portant des groupes X et Y fixés, sont des polymères réticulés.

Les produits ainsi obtenus, qui sont insolubles dans l'eau et dans les fluides biologiques, permettent de façonner divers objets tels que des prothèses cardiovasculaires, des cathé-

ters, des fils de suture, etc... en matériau anticoagulant.

Suivant un autre mode de réalisation avantageux de l'objet de la présente invention, les polymères portant des groupes X et Y fixés sur leurs chaînes macromoléculaires, sont des polymères non réticulés et solubles.

Les produits ainsi obtenus qui sont solubles dans l'eau et dans les fluides biologiques permettent de préparer des solutions à action anticoagulante à usage pharmaceutique.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des produits doués d'une action anticoagulante conformes à la présente invention, caractérisé en ce qu'au cours d'une première étape, on prépare un polymère chlorosulfoné $\text{POL-SO}_2\text{Cl}$ par réaction de l'acide chlorosulfonique sur le polymère dans un solvant approprié, et en ce qu'au cours d'une deuxième étape on transforme les groupes $-\text{SO}_2\text{Cl}$ en groupes $-\text{SO}_2\text{Na}$ et en groupes $-\text{SO}_2\text{AA}$ (où AA représente un acide aminé) par réaction avec une quantité appropriée d'un acide aminé en milieu basique.

Suivant un mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, dans le cas où on désire obtenir des polymères substitués solubles à action anticoagulante, la sulfonation du polymère non réticulé a lieu dans un milieu organique avantageusement constitué par un solvant chloré et plus particulièrement par le dichlorométhane, le polymère est précipité dans du nitrométhane et la réaction avec l'acide aminé a lieu dans un milieu contenant le mélange eau-dioxane.

Suivant un mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, dans le cas où on désire obtenir des polymères substitués insolubles à action anticoagulante, la sulfonation du polymère réticulé a lieu dans un mélange contenant du dichlorométhane et du nitrométhane, et la réaction avec l'acide aminé a lieu dans un milieu contenant le mélange eau-dioxane.

Suivant un mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention et afin d'éliminer le plus complètement possible toute impureté susceptible d'interagir avec les facteurs de la coagulation, on procède dans le cas de polymères insolubles, après la fixation des acides aminés, à un lavage abondant à l'eau suivi de lavages par une solution de NaCl (1,5 M), puis de lavages au citrate de Na (1 M), d'un équilibrage à

pH 7,30 environ par plusieurs lavages avec du tampon de MICHAELIS, un nouveau lavage à l'eau et enfin un séchage.

Suivant un autre mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, dans le cas de polymères solubles, on élimine les 5 impuretés après la fixation de l'acide-amino par dialyse contre de l'eau et on récupère, si on le désire, le produit fini pur par lyophilisation.

La présente invention a également pour objet des articles à usage médical et chirurgical tels que tubes, prothèses cardiovasculaires, cathéters, fils, films et analogues en polymères 10 comportant des groupes substituables, rendus anticoagulants par fixation sur leur surface extérieure des groupes X et Y tels que définis précédemment. Autrement dit, il suffit tout d'abord de façonner un objet de forme et de dimensions voulues à partir d'un polymère comportant des groupes substituables, puis de fixer 15 chimiquement (en mettant en oeuvre, par exemple, le procédé décrit plus haut) les groupes X et Y en quantités voulues et aussi élevées qu'on le désire, pour obtenir un matériau solide à action anticoagulante, très stable dans le temps, ne subissant aucun relargage ni dégradation.

20 La présente invention a en outre pour objet, des compositions pharmaceutiques constituées par, ou contenant les polymères non réticulés substitués par des groupes leur conférant une action anticoagulante et solubles dans l'eau, lesdits polymères étant présents dans lesdites compositions pharmaceutiques à raison d'une dose thérapeutiquement active.

25 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre.

La présente invention vise plus particulièrement l'utilisation des polymères comportant des groupes X et Y tels que définis plus haut fixés sur leur chaîne macromoléculaire, en 30 tant que produits à action analogue à celle de l'héparine, ainsi que des objets fabriqués à partir de ces polymères.

L'invention pourra être mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et de caractérisation des produits objet de 35 la présente invention, à une étude de l'activité anticoagulante, et d'autres propriétés analogues à celles de l'héparine de ces produits, et à une évaluation de l'activité propre de chaque type de substituant.

Il doit être bien entendu, toutefois, que les différents

exemples, caractéristiques et étude qui seront décrits ci-après et représentés sur les dessins annexés, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, mais n'en constituent en aucune manière une limitation.

5 I - PREPARATION DES MATERIAUX ET REACTIFS

Les matériaux suivants ont été préparés :

a) produits à action anticoagulante conformes à l'invention

[tous ont comme polymère support, le Polystyrène (PS)]

	<u>N° de Référence</u>	<u>Nom du produit</u>
10	1	PS-hydroxyproline
	2	PS-proline
	3	PS-alanine
	4	PS-phénylalanine
	5	PS-acide glutamique
15	6	PS-méthionine
	7	PS-thréonine
	8	PS- α ou ϵ -benzyloxycarbonyl-lysine
	9	PS- ϵ -tertobutyloxycarbonyl-lysine

b) produits d'étude et de comparaison

	<u>N° de Référence</u>	<u>Nom du produit</u>
20	10	PS-lysine (diamino-acide)
	11	PS-CH ₂ -Proline (l'acide aminé est fixé par l'intermédiaire du pont -CH ₂ -)
25	12	PS-CH ₂ -hydroxyproline (l'acide aminé est fixé par l'intermédiaire du pont -CH ₂ -)
	13	PS-CH ₂ -alanine (l'acide aminé est fixé par l'intermédiaire du pont -CH ₂ -)
30	14	PS-butylamine (fixation d'une amine et non plus d'un acide aminé)
35	15	PS-SO ₃ (résine sulfonée seulement)

Le polystyrène de départ est un copolymère de styrène et de 2 % de divinylbenzène, commercialisé par FLUKA. Il est utilisé sous forme de billes de 200 à 400 mesh de diamètre, soit entre

0,037 et 0,074 mm de diamètre. Le produit commercial est lavé successivement avec une solution 1M de NaOH, de l'eau, une solution 1M de HCl et de l'eau. Il est séché sous vide à 60°C.

Les acides aminés utilisés sont des réactifs "FLUKA S puriss".

c) Préparation du PS-SO₃ (15)

On laisse gonfler une nuit, à la température ambiante, 25 g de polystyrène dans 200 ml de dichlorométhane. On ajoute alors un mélange de 160 ml de nitrométhane et de 140 ml d'acide chlorosulfonique. La suspension est agitée pendant 7 heures à 40°C. La résine brute est alors filtrée, lavée avec précaution avec du nitrométhane et de l'acétone. Elle est finalement séchée sous vide à 50°C.

Le taux de groupes chlorosulfonyle (-SO₂Cl) est déterminé de la façon suivante : 200 mg de polystyrène chlorosulfoné sont hydrolysés avec 50 ml d'une solution 1M de NaOH pendant 24 heures au reflux. Après acidification, les ions Cl⁻ sont titrés par une solution 0,1M de AgNO₃ en utilisant une électrode indicatrice d'argent.

Le polystyrène sulfoné est hydrolysé quantitativement par la soude 2 M à la température ambiante. On filtre, on lave à l'eau et on sèche sous vide.

d) Préparation de produits 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14

86 mmoles de l'acide aminé sont dissoutes dans 130 ml du mélange 3:2 eau-dioxane par addition du minimum de soude 4 M. Le pH est mesuré et on ajoute alors 10 g du polystyrène chlorosulfoné tel qu'obtenu plus haut (43 meq -SO₂Cl). Le pH est ensuite maintenu à sa valeur initiale par addition de soude 2 M. La réaction est arrêtée quand le pH reste stable. Le polymère est alors filtré, abondamment lavé à l'eau, avec de la soude 10⁻² M et de l'eau. Il est enfin séché sous vide.

e) Préparation des polymères PS-CH₂-AA 11, 12, 13 (dans lesquels l'acide aminé est fixé au polystyrène par l'intermédiaire du pont -CH₂-)

1ère étape : Préparation du polystyrène chlorométhylé

On fait gonfler pendant 30 mn, 25 g de polystyrène réticulé à 25°C dans 150 ml de chloroforme. On ajoute alors 100 ml

d'ether monochlorodiméthylrique et 10 ml de chlorure stannique.

On laisse la réaction se poursuivre 1,5 heure sous agitation à la température ambiante. La résine est alors filtrée, lavée avec un mélange 3/1 de dioxane/eau, puis avec un mélange 3/1 de dioxane/acide chlorhydrique 3N. Le polymère est ensuite lavé avec des mélanges eau/dioxane de plus en plus riches en dioxane, avec du dioxane, puis avec des mélanges dioxane/méthanol de plus en plus riches en méthanol, et enfin avec du méthanol. La résine est alors séchée sous vide à 50°C.

Le taux des groupes chlorométhyle ($-\text{CH}_2\text{Cl}$) est déterminé de la façon suivante : 200 mg de polystyrène chlorométhylé sont quaternisés dans 5 ml de butylamine pure à l'ébullition pendant 6 heures. Après acidification du milieu par l'acide nitrique, les ions Cl^- sont titrés par une solution 0,1 M de AgNO_3 en utilisant une électrode indicatrice d'argent.

2ème étape : obtention du sel de sulfonium

20 g de polystyrène chlorométhylé (80 mmoles) sont mis en suspension dans un mélange de 30 ml de diméthylsulfure (400 mmoles), 100 ml d'eau et 120 ml d'isopropanol. Le mélange est agité pendant 48 heures à la température ambiante. Le rendement de la réaction est déterminé par titration potentiométrique des ions Cl^- contenus dans une partie aliquote du milieu réactionnel. Ce rendement est d'environ 80 %. Le sel de sulfonium n'est pas isolé.

3ème étape : fixation de l'acide-amino

A la suspension précédente, on ajoute 64 mmoles de soude et 120 mmoles du sel de sodium de l'acide-amino dans 170 ml d'isopropanol et 200 ml d'eau (rapport AA/groupes $-\text{CH}_2\text{S}^+(\text{CH}_3)_2 = 2$). Le mélange réactionnel est agité au reflux pendant 24 heures. La résine brute est alors filtrée et remise en suspension dans l'ammoniaque 4 M au reflux pendant 4 heures, pour éliminer le diméthylsulfure. Le polymère $\text{PS}-\text{CH}_2-\text{AA}$ est alors filtré, lavé successivement avec de l'eau, de l'HCl 1M, de l'eau et de la soude 1 M. Il est ensuite lavé plusieurs fois à l'eau jusqu'à ce que le filtrat soit neutre. Le polymère est alors séché sous vide.

Les caractéristiques des produits préparés selon d) et e) sont résumées dans le Tableau I qui va suivre.

f) Préparation de produits à action anticoagulante, solubles1ère étape : synthèse du polystyrène chlorosulfoné

On dissout 25 g de polystyrène non réticulé dans 200 ml de dichlorométhane. On ajoute alors sous forte agitation, 5 16 ml d'acide chlorosulfonique et on laisse la réaction se poursuivre pendant 7 heures à 40°C. On ajoute alors du nitrométhane pour précipiter tout le polymère. On filtre et on lave au nitrométhane pour éliminer toute trace d'acide chlorosulfonique. Le polymère est alors séché sous vide. Le taux 10 des groupes chlorosulfonyl est déterminé de la façon suivante : 200 mg de polystyrène chlorosulfoné sont hydrolysés avec 50 ml d'une solution 1 M de NaOH pendant 24 heures au reflux. Après acidification, les ions Cl^- sont titrés par une solution 0,1 M de AgNO_3 en utilisant une électrode indicatrice 15 d'argent.

2ème étape : fixation de l'acide-amino

50 mmol d'acide-amino (sous forme de sel de sodium) sont dissoutes dans 100 ml du mélange 3-2 eau-dioxane. Le pH est mesuré et on ajoute 10 g du polymère précédent. Le pH est 20 ensuite maintenu à sa valeur initiale telle que mesurée, par addition de soude 2 M. On arrête la réaction quand le pH reste stable. Le milieu réactionnel est alors dialysé contre de l'eau et on récupère le produit pur par lyophilisation.

II - CONDITIONNEMENT ET GRANULOMETRIE

25 Le polystyrène de départ est une résine commerciale dont les grains, sphériques, ont un diamètre moyen de 30 à 80 μ . La fixation des différentes fonctions modifie peu la taille des grains à l'état sec, mais augmente sensiblement leurs dimensions en suspension en milieu aqueux, puisque ces fonctions donnent au 30 polystyrène ainsi modifié un caractère hydrophile marqué.

Une étude préliminaire ayant montré que l'activité anticoagulante est fonction de la surface spécifique des grains, celle-ci a été augmentée par broyage. Les échantillons broyés ont ensuite été mis en suspension dans du tampon de MICHAELIS et 35 fractionnés selon la taille des grains, afin d'éliminer les particules d'un diamètre moyen inférieur à 2 μ environ qui restent en suspension quasi-colloïdale.

Ainsi, les billes de différents polymères brutes obtenues,

sont tout d'abord lavées, équilibrées à pH 7,35 (tampon de MICHAELIS), puis séchées. Les billes de résine sont ensuite broyées (par déplacements très rapides de billes d'agate dans un moule d'agate), afin de réduire la taille des particules étudiées. Pour éliminer les très fines particules, le produit brut est lavé plusieurs fois par mise en suspension dans du tampon de MICHAELIS, suivie d'une décantation et de l'élimination du surnageant. La distribution granulométrique des échantillons obtenus est déterminée par microscopie quantitative ("Technic Analysis System"). Ce fractionnement en fonction de la taille des particules, rend possible l'étude de l'activité anticoagulante sur des échantillons dont la distribution des dimensions des grains est quasi-identique.

III - TESTS DE COAGULATION

15 Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) est préparé à partir de plasma humain frais par centrifugation (4°C - 10 000 g - 30 minutes). Il est stocké à -20°C, dégelé par petites quantités et maintenu alors à 4°C.

Le fibrinogène utilisé est du fibrinogène bovin purifié (Behring) à une concentration de 6 g/l dans NaCl à 0,85 %. La solution est faite juste avant l'emploi et conservée à 37°C.

La thrombine (Roche, 50 NIH/mg), l'antagoniste de l'héparine [polybrène ou polylysine (Sigma)] sont dilués extemporanément dans du tampon de MICHAELIS et conservés à 4°C (pour la thrombine) ou à la température ambiante (pour le polybrène et la polylysine). La reptilase (Stago) est diluée dans l'eau distillée et conservée à 37°C. L'antithrombine III (Kabi) est en solution dans l'eau distillée et conservée à 4°C.

Les polymères sont en suspension dans du tampon de MICHAELIS additionné de 1 g/l d'un agent émulsifiant (Lensex TA 01 - NP 40 Shell).

Tous les temps de coagulation sont déterminés à 37°C en tube de verre par observation directe.

IV - ETUDE DE L'ACTIVITE ANTICOAGULANTE

35 L'activité anticoagulante des résines a été étudiée par détermination des temps de thrombine de plasma décalcifié et pauvre en plaquettes (PPP) ou de solution de fibrinogène en présence de suspension de la résine à étudier en concentration varia-

ble. Des études préliminaires de plusieurs résines PS-SO₃ contenant des proportions variées de groupes -SO₃Na, ont montré que le temps de thrombine ne dépend que de la quantité de groupes -SO₃Na présents dans un volume donné de PPP au moment du test.

5 En conséquence, pour pouvoir comparer directement l'activité anticoagulante de différentes résines, les temps de thrombine ont été portés en fonction de la quantité de résine exprimée en concentration de -SO₃Na.

Les résultats sont représentés sur la figure 1. On a porté en ordonnée le temps de thrombine en secondes, et en abscisse la concentration de la suspension de polymère (exprimée en nombre de groupes SO₃⁻/ml) pour 30 U/ml de thrombine (figure 1a), 50 U/ml de thrombine (figure 1b) et 75 U/ml de thrombine (figure 1c).

15 Les courbes 1 correspondent à la résine PS-SO₃ avec du PPP.

Les courbes 2 correspondent à la résine PS-SO₂-Glu avec du PPP.

20 Les courbes 3 correspondent à la résine PS-SO₃ avec la solution de fibrinogène.

Les courbes 4 correspondent à la résine PS-SO₂-Glu avec la solution de fibrinogène.

Une suspension de 0,1 ml de polymère (de concentration variable) est incubée avec 0,2 ml de PPP (courbes continues sur la figure 1) ou d'une solution de fibrinogène (courbes en traits discontinus sur la figure 1) pendant 30 minutes à 37°C. On ajoute alors 0,1 ml de thrombine et on mesure le temps de coagulation.

En examinant la figure 1, on constate immédiatement que 30 l'effet anticoagulant de la résine PS-SO₂-Glu est plus grand que celui de la résine PS-SO₃. Cette différence ne peut pas être attribuée à la différence de taille des grains ou de surface spécifique, celle-ci étant beaucoup trop faible pour expliquer les écarts observés sur les temps de coagulation.

35 Dans tous les cas, les contrôles supplémentaires suivants ont été faits :

a) détermination du temps de thrombine du PPP ou de la solution de fibrinogène en l'absence de polymère (temps témoins)

b) Détermination du temps de thrombine sur le surnageant obtenu par centrifugation du PPP préincubé avec le polymère. Dans tous les cas, ce temps a été trouvé très voisin du temps témoin. De plus, pour vérifier que l'augmentation du temps de thrombine n'est pas due à une altération du fibrinogène, on a également déterminé les temps de coagulation par la reptilase, de PPP ou d'une solution de fibrinogène incubés avec le polymère. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les temps de reptilase obtenus en présence ou en l'absence de polymère, ainsi que cela ressort des résultats représentés sur la figure 2. On a tracé sur cette figure 2 le temps de coagulation en secondes en fonction de la concentration de la suspension de polymère (exprimée en nombre de groupes de SO_3^-/ml). La suspension de polymère (0,1 ml) est incubée avec 0,2 ml de PPP pendant 30 minutes à 37°C. On ajoute alors 0,1 ml de thrombine à 9 U/ml (courbe continue) ou de reptilase (courbe en traits discontinus). La concentration de la thrombine a été choisie pour donner un temps témoin identique à la reptilase, à savoir 20 secondes. Les courbes 1 correspondent au PS-SO_3 et les courbes 2 à un polymère conforme à l'invention ($\text{PS-SO}_2\text{-Glu}$).

Les courbes obtenues avec le plasma, pour différentes concentrations de thrombine ont également été transposées en quantité de thrombine inactivée en fonction de la quantité de résine présente dans le test. En effet, en première approximation, on peut considérer qu'un temps de thrombine allongé traduit l'inactivation d'une fraction de la thrombine initiale et déterminer cette fraction en comparant le temps de coagulation obtenu avec une courbe de temps témoins mesurés avec des quantités de thrombine variables. La figure 3 montre les courbes ainsi obtenues.

Les courbes 1 correspondent au polymère PS-SO_3 .

Les courbes 2 correspondent au polymère conforme à l'invention $\text{PS-SO}_2\text{-Glu}$.

Les courbes 3 correspondent aux surnageants ($\text{PPP} + \text{PS-SO}_3$ et $\text{PPP} + \text{PS-SO}_2\text{-Glu}$).

On a porté en ordonnée la thrombine inactivée en U/ml et en abscisse la concentration de la suspension de polymère expri-

mée en nombre de groupes SO_3^-/ml . La quantité de thrombine inactivée a été évaluée à partir d'une courbe d'étalonnage de temps témoins (0,2 ml de PPP son incubés avec 0,1 ml de tampon de MICHAELIS à 37°C. On ajoute 0,1 ml de thrombine - de concentration variable - et on mesure le temps de coagulation). Les temps de thrombine, mesurés après incubation de PPP avec les suspensions de polymère, sont reportés sur cette courbe d'étalonnage, ce qui permet d'évaluer la concentration d'enzyme active, donc la quantité correspondante de thrombine inactivée.

Les courbes représentées sur les figures 3a, 3b, 3c, montrent clairement que la proportion de thrombine inactivée augmente avec la quantité de polymère présente dans le test. Par ailleurs, les mesures de temps de thrombine effectuées sur les sur-nageants (cf. courbes 3) indiquent qu'il n'y a alors aucune inactivation de la thrombine. Ces résultats montrent que l'effet anticoagulant du polymère ne s'exerce que tant que ce dernier est présent dans le PPP.

La comparaison des temps de thrombine obtenus dans les mêmes conditions pour le PPP et la solution de fibrinogène (cf. figures 1 et 3) montre que l'effet anticoagulant du polymère ne se manifeste qu'en présence d'un facteur plasmatique absent de la solution de fibrinogène.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité anticoagulante de ces polymères est une activité antithrombique impliquant l'antithrombine III comme cofacteur plasmatique. En d'autres termes, ces polymères sont des matériaux indiscutablement anticoagulants.

V - ETABLISSEMENT DE LA LOI GENERALE DE VARIATION ENTRE LA QUANTITE DE THROMBINE INACTIVEE ET LA QUANTITE DE RESINE

PS-SO₃AA PRESENTE

L'activité anticoagulante des différents échantillons a été étudiée par détermination des temps de thrombine de PPP incubé avec des quantités croissantes de polymère conforme à l'invention. Au préalable, pour vérifier que l'activité anticoagulante de chaque résine est analogue à celle des échantillons décrits dans le paragraphe IV ci-dessus, et dans le paragraphe IX ci-après, les temps de reptilase de PPP incubé avec le polymère et les temps de thrombine de la solution de fibrinogène

incubée avec le polymère ont été déterminés. Ils sont tous sensiblement égaux aux temps témoins correspondants (déterminés en l'absence de polymère).

L'allongement du temps de thrombine correspondant à l'inactivation d'une fraction de la thrombine initiale, la comparaison entre une courbe d'étalonnage et le temps de coagulation déterminé en présence d'une certaine quantité de résine, permet de déterminer la quantité de thrombine inactivée par cette quantité de résine présente dans le PPP. La figure 4 montre la variation de la quantité de thrombine inactivée en fonction de la concentration de la suspension de résine pour une série de composés contenant de la proline en proportion variable par rapport aux groupes sulfonate. La concentration de la suspension de résine est ici exprimée en milliéquivalents de groupes $-SO_3Na$ par millilitre de suspension, ce qui permet de comparer directement l'effet des groupes proline et montre que l'activité anticoagulante augmente avec le taux de ces groupes.

La figure 4 représente en effet la quantité de thrombine inactivée en fonction de la concentration de la suspension de polymère PS- SO_2 -proline (exprimée en meq- SO_3Na/ml) pour 2,59 meq de proline par g de polymère : (courbe 1)
pour 2,09 meq de proline par g de polymère : (courbe 2)
pour 1,62 meq de proline par g de polymère : (courbe 3)
pour 0,93 meq de proline par g de polymère : (courbe 4)
Une même série de courbes a été obtenue pour chaque acide aminé.

La figure 5 montre la variation de la quantité de thrombine inactivée en ordonnée, en fonction de la concentration de polymère (en mg/ml) pour une résine portant des groupes acide glutamique et pour quatre concentrations de thrombine :
- 12 U/ml (courbe 1)
- 30 U/ml (courbe 2)
- 50 U/ml (courbe 3)
- 75 U/ml (courbe 4)

Les mêmes courbes ont été établies pour tous les autres produits conformes à l'invention, préparés, et on a constaté que la loi de variation est dans tous les cas la même. Cette variation est tout d'abord linéaire, ce qui montre que la quantité de

thrombine inactivée est proportionnelle à la quantité de polymère présent quelle que soit la concentration de thrombine utilisée. Cependant, pour atteindre 100 % d'inactivation, un excès de polymère est toujours nécessaire. L'extrapolation de la tangente à l'origine permet pour chaque polymère, de déterminer la quantité de résine théoriquement nécessaire pour inactiver totalement une certaine quantité de thrombine. Ceci résulte clairement de la figure 6 où les grandeurs ont été portées en coordonnées réduites: en ordonnée, la thrombine inactivée en % du total, et en abscisse la quantité de polymère en % de la quantité théoriquement nécessaire pour inactiver toute la thrombine présente.

La figure 7 permet de vérifier que cette loi de proportionnalité est générale. En effet, chaque point correspond ici à la quantité de polymère nécessaire pour inactiver 30 unités de thrombine en fonction de la quantité du même polymère nécessaire pour inactiver 12 unités de thrombine. Tous ces points sont sensiblement alignés et très voisins de la droite de pente 30/12 correspondant à la proportionnalité, ce qui montre que la loi de variation est valable pour tous les amino-acides étudiés. Il est alors possible de déterminer une activité pour chaque résine comme l'inverse de la quantité de résine nécessaire pour inactiver 30 unités de thrombine. En utilisant cette valeur comme référence, on peut alors montrer que la loi de proportionnalité est valable pour des concentrations de thrombine variant de 12 à 75 unités/ml, comme le montre la figure 8 où on a porté en abscisse la concentration de la thrombine et en ordonnée le rapport :

Polymère nécessaire pour inactiver X unités de thrombine

Polymère nécessaire pour inactiver 30 unités de thrombine

En résumé, il résulte clairement des figures 7 et 8 :

- 30 - que l'on arrive à inactiver toute la thrombine présente à condition d'ajouter une quantité suffisante de polymère conforme à l'invention
- que la même loi d'inactivation est suivie par tous les produits conformes à l'invention, quel que soit l'acide-amino (AA) et
- 35 - quelle que soit la quantité de cet AA présente dans la résine.

VI - CAS DES DIAMINO-ACIDES (LYSINE)

On a représenté sur la figure 9, les courbes de variation de la quantité de thrombine inactivée (en ordonnée en U/ml) en

fonction de la quantité de résine présente dans le test.

La courbe 1 concerne le polymère PS-SO₂-Lysine

La courbe 2 concerne le polymère sulfoné PS-SO₃

La courbe 3 concerne le polymère PS-SO₂-Proline

5 La courbe 4 concerne le polymère PS-SO₂-α Z Lysine

La courbe 5 concerne le polymère PS-SO₂-Glutamique

Z étant le groupe électroattracteur benzyloxycarbonyle.

La quantité de résine étant exprimée en concentration de groupes sulfonate par millilitre de suspension pour toutes les
10 résines, les courbes supérieures à celle d'une résine ne contenant que des groupes sulfonate (courbe 2) indiquent que l'acide correspondant confère à la résine sur laquelle il est fixé, une activité anticoagulante supplémentaire par rapport à celle de ses seuls groupes sulfonate. C'est le cas de tous les aminoacides sauf la lysine. Dans ce cas au contraire, la courbe est inférieure à celle d'une résine ne contenant que des groupes sulfonates (PS-SO₃), c'est-à-dire que la présence de la lysine sur la résine revient à "neutraliser" une partie de l'activité anticoagulante des sites sulfonate. Ceci est à rapprocher de l'effet
15 inhibiteur, décrit au paragraphe IX ci-après, observé avec la polylysine dont les sites amino- des chaînes latérales, protonés à pH 7,35, neutralisent les sites négatifs, notamment sulfonates, d'une résine PS-SO₃, ou PS-SO₂AA, ou de l'héparine.

Par contre, quand on a bloqué une fonction amine de la
25 lysine (courbe 4), cette neutralisation n'est plus possible et le polymère retrouve pleinement ses propriétés.

VII - CAS DES RESINES PS-CH₂-AA (L'ACIDE AMINE EST LIE AUX CHAINES MACROMOLECULAIRES PAR L'INTERMEDIAIRE DU PONT -CH₂-)

Cette étude a porté sur trois résines contenant respectivement de la proline, de l'hydroxyproline et de l'alanine (cf. Tableau I : composés 11, 12 et 13). Dans chaque cas, les temps de thrombine de PPP incubé avec des quantités variables de résine ont été déterminés. Ils ont toujours été trouvés sensiblement égaux au temps témoin, quelle que soit la quantité de résine présente.
35 sente.

VIII - EVALUATION DE L'ACTIVITE PROPRE DE CHAQUE TYPE DE SUBSTITUANT

A partir de l'activité de chaque résine définie précé-

demment par rapport à 30 unités de thrombine, on peut déduire l'activité rapportée à 1 unité de thrombine (cf. Tableau I). Si les effets des différents substituants de la résine sont additifs, l'activité "a" peut s'exprimer par la relation (1) ci-après :

$$a(C_{SO_3^-} + C_{AA}) = a_{SO_3^-} C_{SO_3^-} + a_{AA} C_{AA} \quad (1)$$

où $a_{SO_3^-}$ et a_{AA} sont les activités respectivement d'un groupe sulfonate et d'un groupe $-SO_2$ -amino-acide, $C_{SO_3^-}$ et C_{AA} étant leurs concentrations respectives.

La figure 10 montre les droites obtenues en portant l'activité de la résine "a", multipliée par le rapport du nombre total de sites et du nombre de sites sulfonates

$$\frac{C_{SO_3^-} + C_{AA}}{C_{SO_3^-}} \quad (\text{en ordonnée})$$

en fonction du rapport des nombres de sites $-SO_2$ -amino-acides et sulfonates

$$\frac{C_{AA}}{C_{SO_3^-}} \quad (\text{en abscisse})$$

Ces droites ont une ordonnée à l'origine commune égale à l'activité d'un groupe sulfonate ($a_{SO_3^-}$) et des pentes égales aux activités des groupes amino-acides (a_{AA}).

La droite 1 correspond au polymère PS- SO_2 -But- NH_2

La droite 2 correspond aux polymères PS- SO_2 -alanine

PS- SO_2 -phénylalanine

La droite 3 correspond aux polymères PS- SO_2 -Lysine

PS- SO_2 -hydroxyproline

PS- SO_2 -méthionine

PS- SO_2 -proline

PS- SO_2 -thréonine

La droite 4 correspond au polymère PS- SO_2 -Acide glutamique.

Ces activités des différents types de substituants sont regroupées dans le Tableau II ci-après.

TABLEAU II
 ACTIVITE DE CHAQUE TYPE DE SUBSTITUANT
 Pour 1 unité de thrombine

5	Substituant	Coefficient d'activité en (meq ⁻¹)	Substituant	Coefficient d'activité en (meq ⁻¹)
	-SO ₂ Glu	≈ 370	-SO ₂ Z Lys	≈ 130
10	$\left. \begin{array}{l} -SO_2OH \text{ Pro} \\ -SO_2 \text{ Pro} \\ -SO_2 \text{ Met} \\ -SO_2 \text{ Thr} \end{array} \right\}$	compris entre 120 et 150	$\left. \begin{array}{l} -SO_2 \text{ Ala} \\ -SO_2 \text{ Phe} \end{array} \right\}$	compris entre 60 et 80
15	-SO ₃ ⁻	≈ 60	-SO ₂ But NH ₂	0

On voit clairement que :

- l'activité de la butylamine est nulle, ce qui semble indiquer que le groupe sulfamide seul n'est pas suffisant pour conférer à la résine une activité antithrombique et que les substituants dépourvus de fonction acide carboxylique n'ont aucun effet sur cette activité.
- Les groupes alanine et phénylalanine ont une activité comprise entre 60 et 80 meq⁻¹, voisine de celle du groupe sulfonate, 60 meq⁻¹, ce qui pourrait indiquer qu'une chaîne latérale hydrocarbonée n'a pratiquement aucun rôle et que l'activité de la fonction carboxylique de l'acide-amino est du même ordre de grandeur que celle du groupe sulfonate. La faible différence entre l'alanine et la phénylalanine s'explique probablement par le caractère hydrophobe plus marqué de la chaîne latérale de la phénylalanine par rapport à l'alanine.
- La lysine dont la fonction amine de la chaîne latérale est substituée par un groupe attracteur d'électrons (groupe Z) a une activité positive, mais difficile à définir avec précision dans la mesure où il n'a pas été possible de synthétiser des résines contenant plus de groupes amino-acide que de groupes sulfonate. Le même problème s'est posé pour la lysine, mais dans ce cas l'activité, très mal définie également, est négative.

tive.

- Les amino-acides dont la chaîne latérale contient un hétéro-atome, comme l'hydroxyproline, la thréonine et la méthionine, ont une activité plus élevée comprise entre 120 et 150 meq⁻¹.
- 5 La proline semble également pouvoir être rattachée à ce groupe. Il faut noter que deux de ces amino-acides, proline et hydroxyproline, fixés sur le polystyrène par un groupe méthylène (résine PS-CH₂AA) ne confèrent aucune activité anticoagulante au matériau.
- 10 - L'acide glutamique a une activité plus élevée que tous les autres amino-acides, probablement liée à ses deux fonctions carboxyliques.

L'ensemble de ces résultats permet de tirer un certain nombre de conclusions. Le groupe sulfamide n'est pas suffisant
15 pour qu'il y ait une activité anticoagulante ; cependant, il semble qu'il soit nécessaire puisque les résines PS-CH₂-AA n'ont aucune activité.

Les groupes sulfonates, en revanche, sont suffisants pour qu'il y ait activité anticoagulante (cf. également le travail de GREGOR précédemment cité), mais celle-ci est faible à
20 très faible, au maximum 15 % de celle de l'héparine, quand tous les sites du polymère (PS) sont substitués par des groupes SO₃⁻.

Par contre, quand la chaîne macromoléculaire porte à la fois des groupes sulfonates, des amino-acides fixés par un pont
25 sulfamide et que les amino-acides ont une chaîne latérale favorable, l'activité anticoagulante du matériau peut être très importante.

IX - AUTRES PROPRIETES ANALOGUES A L'HEPARINE DE COMPOSES CONFORMES A L'INVENTION

30 A - Etude de l'action des inhibiteurs

Les inhibiteurs de l'héparine (polybrène et polylysine) peuvent inhiber totalement l'effet anticoagulant des polymères conformes à l'invention.

Les résultats sont représentés sur la figure 11 annexée
35 (dans laquelle on a porté en ordonnée le temps de thrombine en secondes, et en abscisse la concentration de l'inhibiteur en mg/ml). Le système de coagulation est le suivant : la suspension de polymère (0,1 ml) est incubée avec 0,2 ml de PPP et 0,1 ml

d'inhibiteur (de concentrations variables) pendant 30 minutes à 37°C. On ajoute alors 0,1 ml de thrombine (12 U/ml) et on mesure le temps de coagulation. Les courbes 1 concernent le polybrène et les courbes 2 la polylysine.

5 La figure 11a représente les résultats obtenus avec le PS-SO₂-Glu et la figure 11b ceux obtenus avec le polymère PS-SO₃. On voit sur la figure 11 que cette inhibition n'est totale qu'à condition qu'il y ait un excès de charges positives de l'inhibi-
10 teur par rapport aux charges négatives du polymère, alors que pour l'héparine elle est totale sans excès. Il est à noter également qu'il faut un excès plus grand avec le polybrène qu'avec la polylysine. Ces résultats indiquent qu'une grande proportion des sites négatifs accessibles de la résine, sont impliqués dans son activité anticoagulante.

15 B - Etude de l'inactivation de la thrombine par les polymères en présence ou en l'absence d'antithrombine III

Cette seconde étude a été faite en deux séries :

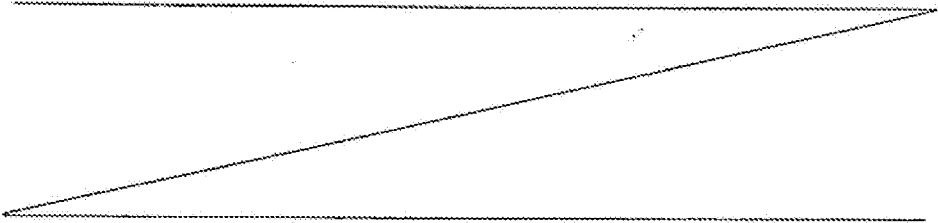
- 20 a) les polymères sont incubés avec de la thrombine ou successivement avec de la thrombine et du polybrène.
b) Les polymères sont incubés avec de la thrombine et de l'antithrombine III ou successivement avec de la thrombine, de l'antithrombine III et du polybrène.
25 Dans tous les cas, le mélange est alors centrifugé et le surnageant est ajouté à du PPP ou à une solution de fibrinogène. On mesure alors le temps de coagulation (cf. Tableau III ci-après). Les résultats obtenus montrent qu'en l'absence d'antithrombine III, la throm-
30 bine est inactivée de façon réversible par le polymère ; son activité réapparaît en présence de polybrène. En revanche, en présence d'antithrombine III, l'inactivation de la thrombine par le polymère est irréversible, comme c'est le cas avec l'héparine.
- 

TABLEAU III
ETUDE DE L'INACTIVATION DE LA THROMBINE PAR LES
POLYMERES EN PRESENCE OU EN L'ABSENCE D'ANTITHROMBINE III

5	Echantillon		Thrombine	Thrombine	Thrombine	Thrombine
			+ tampon (a)	+ polybrène (b)	+ antithrombine + tampon (c)	+ antithrombine + polybrène (d)
10	PS-SO ₃	PPP	70	45	250	64
		Solution de fibrinogène	110	44	300	60
15	PS-SO ₂ Glu	PPP	112	45	300	65
		Solution de fibrinogène	150	47	360	62

Système de coagulation : une suspension (0,2 ml) de polymère dans
 20 du tampon est incubée à 0°C avec 0,2 ml de thrombine à
 5 unités/ml (a) (b) ou avec 0,016 ml d'antithrombine III à
 25 unités/ml et 0,2 ml de thrombine à 5 unités/ml (c) (d). Après
 5 minutes, 0,2 ml de tampon (a) (c) ou 0,2 ml d'une solution de
 polybrène (40 mg/ml dans du tampon) (b) (d) sont ajoutés. Après
 25 5 minutes à 0°C, la suspension est centrifugée et 0,3 ml de sur-
 nageant sont ajoutés à 0,2 ml de PPP ou 0,2 ml de solution de fi-
 brinogène à 37°C. Le temps de coagulation (en sec.) est alors me-
 suré. Temps témoin : 45 secondes en l'absence d'antithrombine III
 et 60 secondes en présence d'antithrombine III.

30 Il résulte de la description qui précède que les produits
 conformes à l'invention, préparés par fixation sur un polymère de
 groupes sulfonate et de groupes amino-acide par l'intermédiaire
 d'un pont sulfamide, sont des matériaux présentant une activité
 anticoagulante très marquée. Si l'on choisit comme polymère
 35 support un polymère non réticulé, l'on obtient des produits, à ac-
 tion anticoagulante, solubles, à usage pharmaceutique proprement
 dit, et si l'on choisit comme polymère support un polymère
 réticulé, l'on obtient des produits, à action anticoagulante, inso-

lubles, à usage médical ou chirurgical, par exemple. Cette activité anticoagulante à l'état solide est relativement élevée : elle est du même ordre de grandeur que celle de l'héparine elle-même fixée par des liaisons covalentes sur des matériaux polymères - mais contrairement à cette dernière, les produits conformes à l'invention sont remarquablement stables.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°- Produits doués de propriétés anticoagulantes, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des polymères (homopolymères ou copolymères) comportant dans leur chaîne des groupes substituables sur lesquels sont
5 fixés de façon statistique, des groupes X et Y, où

X désigne SO_3R_1

R_1 étant un atome d'hydrogène ou d'un métal physiologiquement compatible,

et Y désigne le groupe $-\text{SO}_2-\text{R}_2$

10 R_2 étant le reste d'un acide aminé lié au pont $-\text{SO}_2-$ par sa fonction amine $-\text{NH}-$.

2°- Produits selon la Revendication 1, caractérisés en ce que les acides aminés sont choisis parmi ceux qui comportent au moins une fonction carboxylique libre.

15 3°- Produits selon l'une quelconque des Revendications 1 et 2, caractérisés en ce que les acides aminés sont choisis dans le groupe qui comprend l'acide glutamique, l'acide aspartique, la méthionine, la cystéine, l'acide cystéique, la proline, l'hydroxyproline, la thréonine, la sérine, la tyrosine,
20 l'alanine, la phénylalanine, la valine, la leucine, la benzyl-oxycarbonyl-lysine et la tertibutyloxycarbonyl-lysine, substitués ou non.

4°- Produits selon la Revendication 3, caractérisés en ce que l'acide aminé est de l'acide glutamique.

25 5°- Produits selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisés en ce que lorsque les acides aminés possèdent plusieurs fonctions amines, toutes sauf une doivent être bloquées par un groupe électroattracteur physiologiquement acceptable.

30 6°- Produits selon la Revendication 5, caractérisés en ce que le groupe électroattracteur est avantageusement constitué par le benzyloxycarbonyle ou le tertibutyloxycarbonyle.

7°- Produits selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisés en ce que les polymères portant des
35 groupes X et Y fixés, sont des polymères réticulés.

8°- Produits selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisés en ce que les polymères portant des groupes X et Y fixés sur leurs chaînes macromoléculaires, sont

des polymères non réticulés et solubles.

9°- Produits selon l'une quelconque des Revendications 1 à 8, caractérisés en ce que les polymères comportant dans leur chaîne des groupes substituables sur lesquels sont
5 fixés des groupes X et Y, sont des polystyrènes.

10°- Procédé de préparation des produits selon l'une quelconque des Revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'au cours d'une première étape, on prépare un polymère chlorosulfoné $\text{POL-SO}_2\text{Cl}$ par réaction de l'acide chlorosulfonique sur le
10 polymère, dans un solvant approprié, et en ce qu'au cours d'une deuxième étape, on transforme les groupes $-\text{SO}_2\text{Cl}$ en groupes $-\text{SO}_3\text{Na}$ et en groupes $-\text{SO}_3\text{AA}$ (où AA représente un acide aminé) par réaction avec une quantité appropriée d'un acide aminé en milieu basique.

11°- Procédé selon la Revendication 10, caractérisé en ce que la sulfonation du polymère non réticulé a lieu dans un milieu organique avantageusement constitué par un solvant chloré, le polymère est précipité dans du nitrométhane et la
15 réaction avec l'acide aminé a lieu dans un milieu contenant le mélange eau-dioxane.

12°- Procédé selon la Revendication 11, caractérisé en ce que le milieu de sulfonation est constitué par du dichlorométhane.

13°- Procédé selon la Revendication 10, caractérisé en ce que la sulfonation du polymère réticulé a lieu dans un
25 mélange contenant du dichlorométhane et du nitrométhane, et la réaction avec l'acide aminé a lieu dans un milieu contenant le mélange eau-dioxane.

14°- Procédé selon la Revendication 13, caractérisé en ce qu'on procède, après la fixation des acides aminés, à un
30 lavage abondant à l'eau suivi de lavages par une solution de NaCl (1,5 M), puis de lavages au citrate de Na (1 M), d'un équilibrage à pH 7,30 environ par plusieurs lavages avec du tampon de MICHAELIS, d'un nouveau lavage à l'eau et enfin d'un séchage.

15°- Procédé selon la Revendication 11, caractérisé en ce qu'on élimine les impuretés après la fixation de l'acide aminé, par dialyse contre de l'eau et on récupère, si on le
35 désire, le produit fini pur par lyophilisation.

16°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 10 à 15, caractérisé en ce que le polymère mis en oeuvre est le polystyrène.

17°- Objets à usage médical et chirurgical tels que 5 tubes, prothèses cardiovasculaires, cathéters, fils, films et analogues en polymères comportant des groupes substituables, rendus anticoagulants par fixation sur leur surface extérieure des groupes X et Y tels que définis dans la Revendication 1.

18°- Procédé de fabrication des objets selon la Re-
10 vendication 17, caractérisé en ce que l'on façonne un objet de forme et de dimension voulues à partir d'un polymère comportant des groupes substituables et en ce que l'on fixe chimiquement selon l'une quelconque des Revendications 10 et 14, les groupes X et Y tels que définis dans la Revendication 1, en quantités
15 voulues et aussi élevées qu'on le désire, pour obtenir un matériau solide à action anticoagulante.

19°- Objets insolubles à usage médical et chirurgical tels que tubes, prothèses, cathéters, fils, films et analogues façonnés à partir de produits selon l'une quelconque des Reven-
20 dications 1 à 7.

20°- Compositions pharmaceutiques constituées par, ou contenant les polymères substitués par des groupes leur conférant une action anticoagulante solubles dans l'eau, selon la Revendication 8.

21°- Compositions pharmaceutiques selon la Revendica-
25 tion 20, caractérisées en ce qu'elles contiennent une dose thérapeutiquement active desdits polymères substitués.

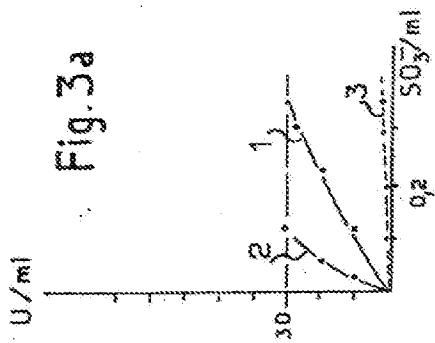
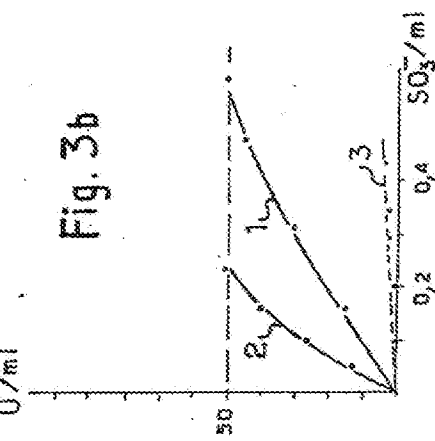
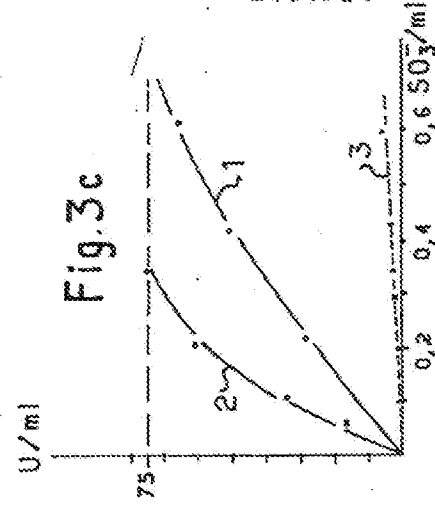
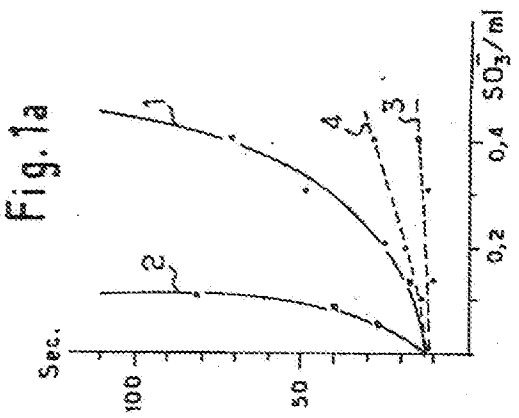
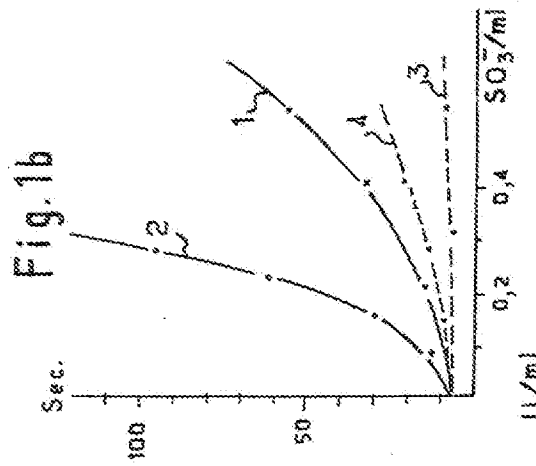
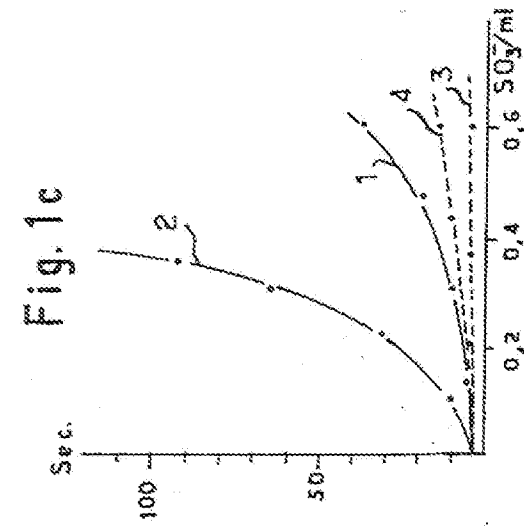


Fig. 2

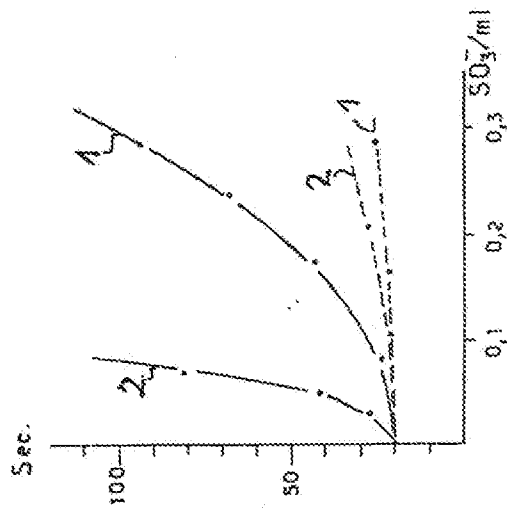


Fig. 11a

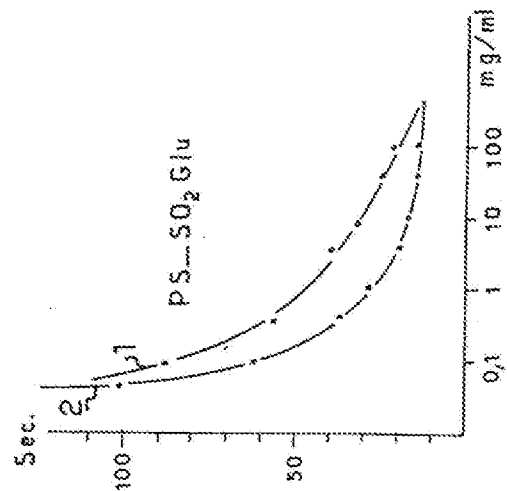


Fig. 11b

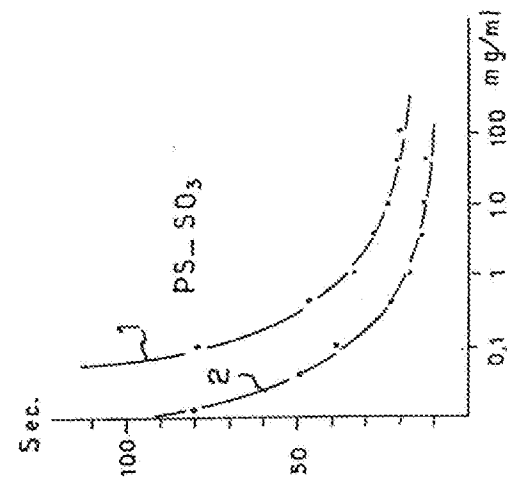


Fig. 4

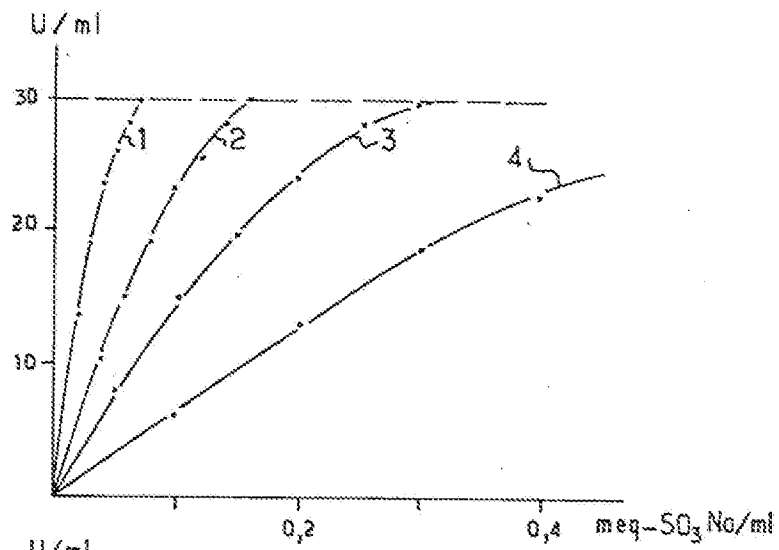


Fig. 5

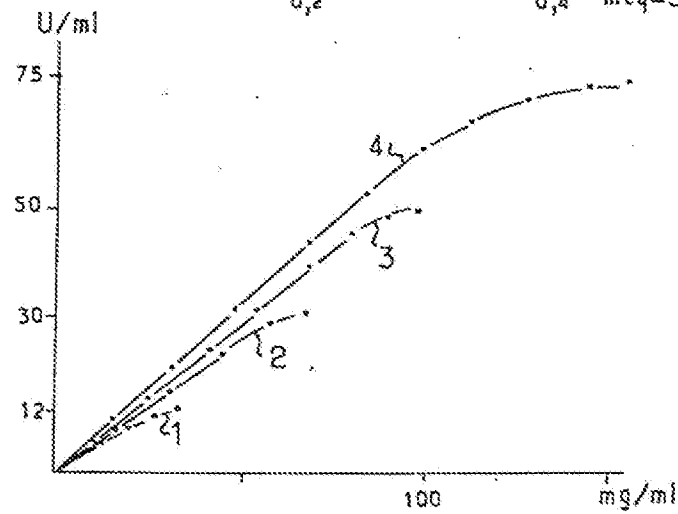
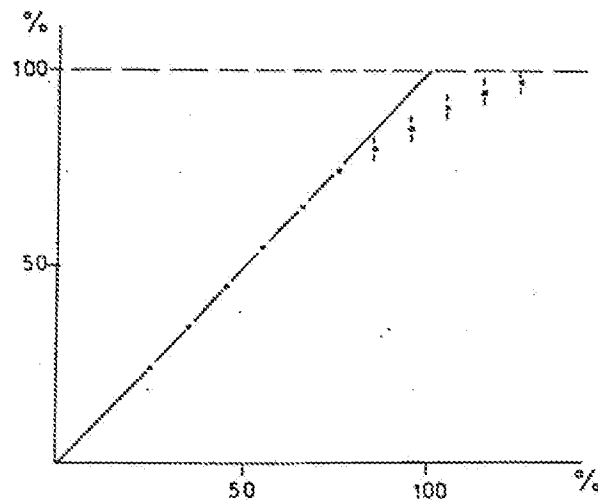


Fig. 6



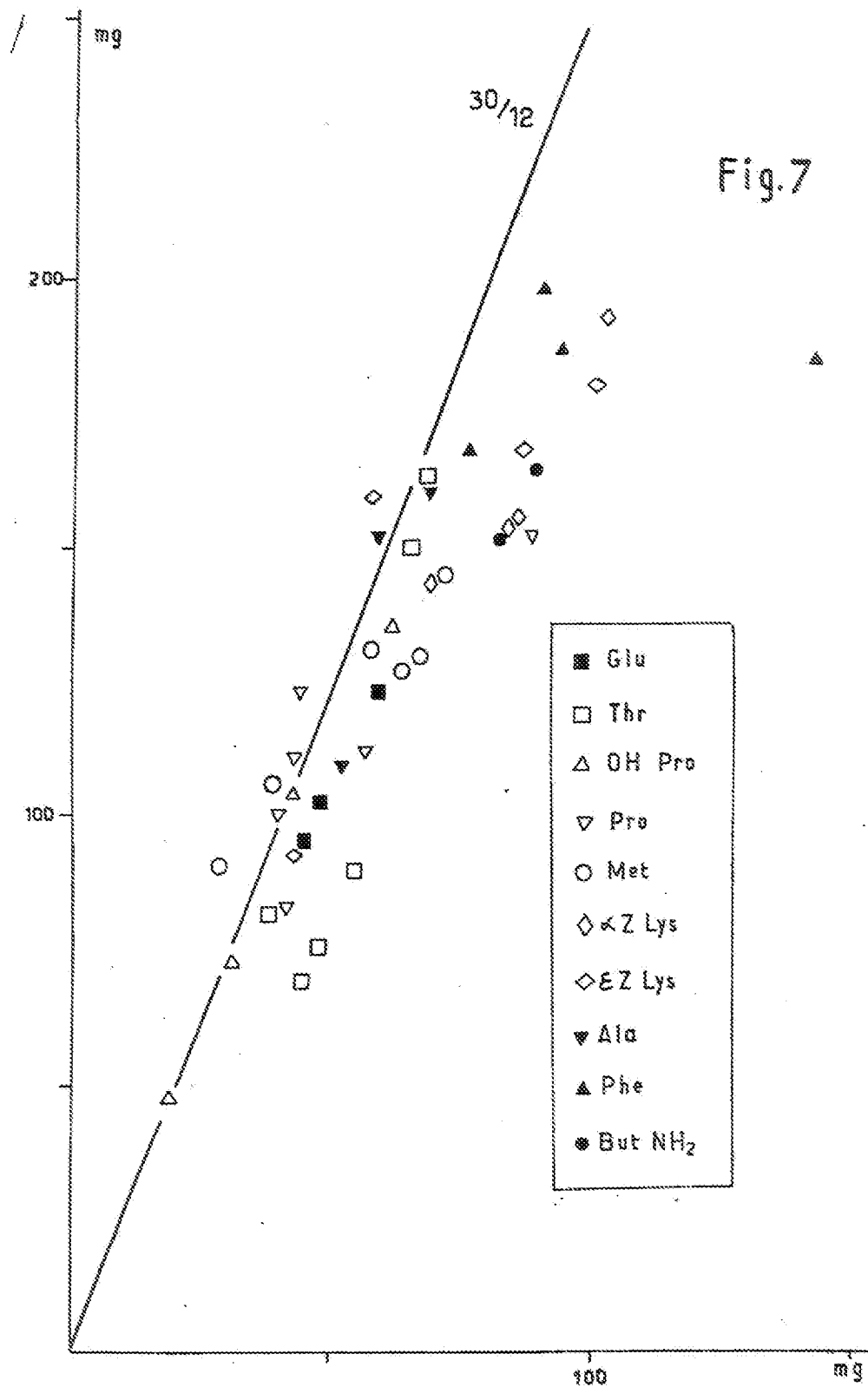
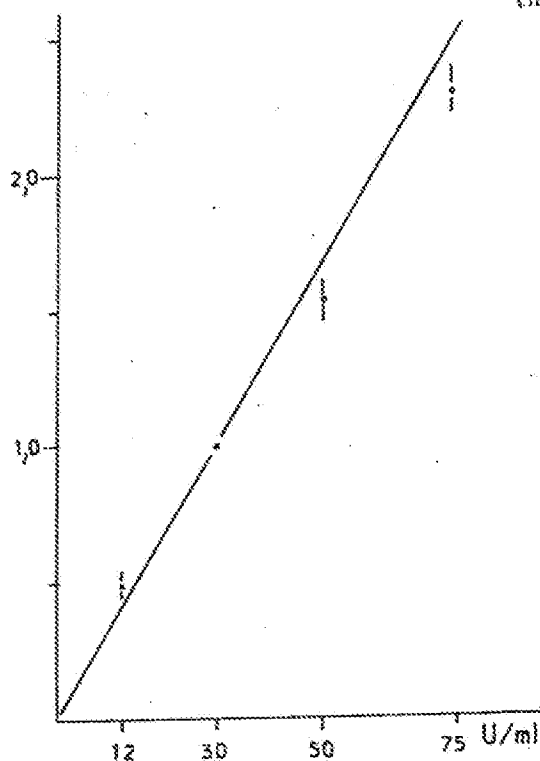


Fig. 8



ACTIVITE DE LA
RESINE
 $(meq^{-1}) \times \frac{C_{SO_3^-} + C_{AA}}{C_{SO_3^-}}$

Fig. 10

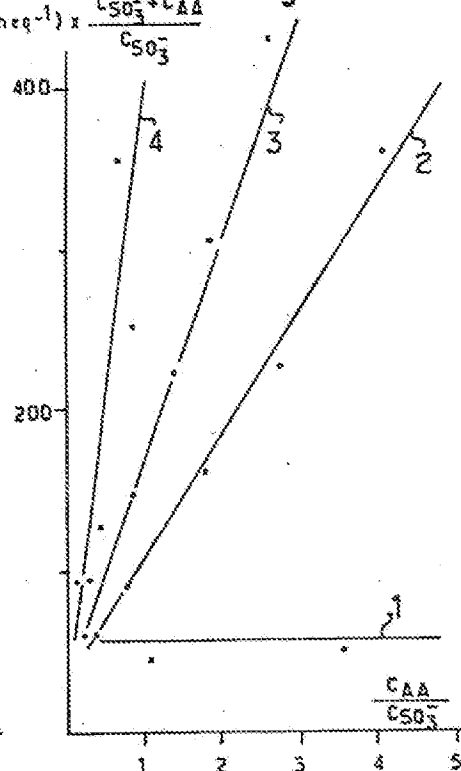


Fig. 9

